

EXPLORATION FONCTIONNELLE DE L'AXE CORTICOTROPE DE LA BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Jessie, Anne, Hélène GALEA épouse GRANDJEAN
Née, le 16 mai 1973 à MARSEILLE (Bouches-du-Rhône)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Véronique GAYRARD-TROY

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Véronique GAYRARD-TROY
Mme Nicole HAGEN-PICARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. **P. BENARD**
Directeurs honoraires..... : MM. **R. FLORIO**
R. LAUTIE
J. FERNEY
G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires..... : MM. **A. BRIZARD**
L. FALIU
C. LABIE
C. PAVAU
F. LESCURE
A. RICO

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

Mme **BURGAT-SACAZE Viviane**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** *Pathologie chirurgicale*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BENARD Patrick**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **GRIESS Daniel**, *Alimentation*
M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **HAY Magali**, *Zootchnie*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MAREDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Parinaud

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Biologie du développement et de la reproduction

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse

Madame le Docteur Gayrard-Troy

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Qui nous a proposé ce sujet de thèse,

Qui nous a initié au travail de recherche,

Qui a fait preuve d'une grande disponibilité et de beaucoup de gentillesse,

Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

Madame le Docteur Hagen-Picard

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui nous a toujours bien encadré,

Qui nous a fait découvrir le travail en équipe,

Pour ses précieux conseils et son attention,

Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude et de nos sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Toutain

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

Qui nous a fait l'honneur de nous intégrer au sein de son équipe,

Qui nous a permis de découvrir le travail de recherche,

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profond respect.

A ma mère,

qui va enfin pouvoir rayer le mot thèse de son vocabulaire,
pour son soutien de chaque instant et son amour.

A mes grand-parents,

qui me sont si chers,
avec toute mon affection.

A Germaine et Antoine,

qui ont apporté la première pierre à l'édifice,
pour avoir cru en moi,
merci infiniment.

**Aux nouveaux membres de ma famille : mes beaux-parents Hélène et Bernard, ma
belle-sœur Sophie et mon beau-frère Frédo,**

qui m'ont toujours bien accueillis,
qui enrichissent ma vie par leurs différences.

A Hélène,

pour sa grande disponibilité,
ses nombreuses heures passées à l'ordinateur et ... sa Forêt Noire.

A mon mari Christophe,

qui supporte tout avec « patience », mon stress comme mes moments de folie,
pour sa présence rassurante.

A Naphtalyne, Cocaïne, Drakkard, Nébraska, MimiGris et Mimine,

ma raison d'être.

A Naphtalyne,

SOMMAIRE

SOMMAIRE	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
TABLE DES PHOTOGRAPHIES, SCHÉMAS, FIGURES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	10
1 - LA TREMBLANTE	10
1.1 Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles	10
1.2 L'agent infectieux	10
1.3 Le tableau clinique	10
1.4 La transmission de la maladie et son contrôle génétique	10
1.5 Les lésions	10
1.6 Le diagnostic	10
2 - LA FONCTION CORTICOSURRENALIENNE	10
2.1 La cortisolémie : production, transport et élimination du cortisol	10
2.2 Le contrôle de la sécrétion de cortisol : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	10
2.2.1 Stimulation de la sécrétion de cortisol par l'ACTH	10
2.2.2 Contrôle hypothalamique	10
2.2.3 Rétrocontrôle négatif du cortisol	10
3 - PROBLEMATIQUE	10
MATERIELS ET METHODES	10
1 - LES ANIMAUX	10
2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL : 2 expériences	10
2.1 Expérience 1	10
2.1.1 Première période	10
2.1.2 Deuxième période	10
2.2 Expérience 2	10

<u>3 - PRELEVEMENTS SANGUINS, TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET ADMINISTRATIONS</u>	29
3.1 Prélèvements sanguins et traitements des échantillons	29
3.2 Administrations	29
<u>4 - HISTOLOGIE</u>	30
<u>5 - METHODE ANALYTIQUE</u>	31
<u>6 - ANALYSES PHARMACOCINETIQUES</u>	32
6.1 Paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide et du oCRF	32
6.2 Evaluation de la réponse corticosurrénalienne à l'administration de tétracosactide	34
6.3 Réponse hypophysaire et corticosurrénalienne à l'administration de oCRF	36
<u>7 - ANALYSE STATISTIQUE</u>	37
<i>RESULTATS</i>	38
<u>1 - EXPERIENCE 1</u>	39
1.1 Période 1	39
1.2. Période 2	40
<u>2 - EXPERIENCE 2</u>	42
<i>DISCUSSION</i>	44
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	49
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	51

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : *Adrenocorticotropic Hormone*, hormone corticotrope.

ACTH₁₋₂₄ : portion de l'ACTH comprenant les 24 premiers acides aminés et correspondant au tétracosactide, ACTH₁₋₃₉ étant l'hormone dans sa totalité structurale.

ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel.

AUC : *Area Under the Curve*, aire sous la courbe délimitée par 2 axes, celui du temps et celui des concentrations.

B_{CBG} : Concentration plasmatique en cortisol lié à la CBG.

B_{max} : Capacité maximale de liaison du cortisol à la CBG.

CBG : *Corticosteroid Binding Globulin* ou transcortine, protéine plasmatique de transport spécifique du cortisol.

CBG_{free} : Concentration plasmatique de cortisol non lié à la CBG.

Cl : Clairance plasmatique d'un analyte, quantité d'analyte éliminée par unité de temps rapportée à la concentration plasmatique en analyte existant avant le processus épurateur.

Cl_{CBGfree} : Clairance plasmatique du cortisol non lié à la CBG.

CRF/oCRF : *Corticotropin Releasing Factor* ou corticolibérine, oCRF est le CRF ovin.

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine ou BSE (*Bovin Spongiform Encephalopathy*).

ESST : Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles.

F : Concentration plasmatique en cortisol libre (F pour free).

11 β -HSD : 11 β -HydroxyStéroïde Déshydrogénase.

11 β -HSD1 : Isoforme 1 de la 11 β -HSD.

iv : Intraveineuse.

k₁₂ : Constante de transfert de premier ordre d'une molécule du compartiment central vers le compartiment périphérique 2.

k₁₃ : Constante de transfert de premier ordre d'une molécule du compartiment central vers le compartiment périphérique 3.

k₂₁ : Constante de transfert de premier ordre d'une molécule du compartiment périphérique 2 vers le compartiment central.

k₃₁ : Constante de transfert de premier ordre d'une molécule du compartiment périphérique 3 vers le compartiment central.

K_d : Constante de dissociation à l'équilibre du cortisol à la CBG. Elle correspond à la concentration de cortisol pour laquelle 50% des sites de fixation de la CBG sont occupés.

MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ est le nouveau variant dont l'ESB serait à l'origine).

MRT : Temps moyen de résidence, c'est le temps moyen passé par une molécule dans l'organisme.

NS : Constante de proportionnalité sans dimension caractérisant la liaison du cortisol à l'albumine.

POMC : Proopiomélanocortine, précurseur de l'ACTH.

PR : Taux de production d'une molécule.

Prn-p : Gène codant pour la protéine prion.

PrP : Protéine prion.

PrP_c : Protéine prion cellulaire.

PrP_{sc} : Protéine prion infectieuse, sc pour scrapie, de PM 33 à 35 kD.

PrP_{res} : Protéine prion résistante à la protéinase K.

RIA : *Radio Immuno Assay*, méthode de dosage radio-immunologique.

T_{1/2} : Temps de demie-vie plasmatique d'une molécule, temps nécessaire pour que la concentration plasmatique de la molécule soit divisée par 2.

t_{last} : Temps qui correspond à la dernière concentration supérieure à la limite de quantification du dosage.

TOT : Concentration plasmatique de cortisol total.

V_c : Volume de distribution du compartiment central.

V_{ss} : Volume de distribution à l'équilibre, constante de proportionnalité entre la quantité d'analyte et la concentration plasmatique dans les conditions d'équilibre.

TABLE DES PHOTOGRAPHIES, SCHEMAS, FIGURES ET TABLEAUX

Photo 1 : Brebis Romanov en phase clinique de tremblante (p.17).

Photo 2 : Vue microscopique (x 400) de la vacuolisation neuronale (flèches) chez une brebis atteinte de tremblante (p.30).

Photo 3 : Coupe sagittale de surrénale de brebis saine, d'un poids de 1,84 g (à droite) et de brebis atteinte de tremblante, d'un poids de 2,92 g (à gauche) (p.31).

Schéma 1 : Coupe sagittale de l'encéphale montrant l'emplacement de l'hypothalamus et l'hypophyse (en noir) (p.22).

Schéma 2 : Représentation simplifiée de l'axe hypothalamo-hypophysaire (p.22).

Schéma 3 : Représentation schématique du rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (p.24).

Figure 1 : Variations temporelles des concentrations plasmatiques d'ACTH et de cortisol évaluées toutes les 10 minutes pendant 4 heures chez des brebis saines (à gauche) et des brebis atteintes de tremblante (à droite) (p.39).

Figure 2 : Effet d'une administration intraveineuse de 5 µg/kg de tétracosactide sur les concentrations plasmatiques moyennes en cortisol total et en cortisol non lié à la CBG (en ng/mL) chez les brebis saines (symbole carré) et chez les brebis atteintes de tremblante (symbole rond) (p.41).

Figure 3 : Variations temporelles des concentrations plasmatiques d'ACTH (en noir) et de cortisol (en gris) observées durant une période s'étendant de 1 heure avant à 5 heures après l'administration intraveineuse de oCRF à la posologie de 0,4 µg/kg chez les brebis saines et celles atteintes de tremblante (p.43).

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques moyens décrivant la disposition du tétracosactide après une injection intraveineuse de tétracosactide à la dose de 5 µg/kg chez 5 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante (p.40).

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques moyens décrivant la disposition du oCRF après une administration intraveineuse de 0,4 µg/kg de oCRF chez 5 brebis saines et 6 brebis atteintes de tremblante (p.42).

INTRODUCTION

L'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Grande Bretagne et la possible transmission de cette maladie à l'homme sous la forme du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) est à l'origine de deux crises économiques dans le monde rural et a relancé l'intérêt du public et des médias pour les encéphalopathies spongiformes d'une façon plus générale et en particulier pour la tremblante du mouton, notamment en raison de sa possible implication dans l'apparition des cas d'ESB.

1 - LA TREMBLANTE

1.1 Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles

La tremblante naturelle des ovins et des caprins a été décrite en France il y a plus de deux siècles et demi. C'est une maladie neurodégénérative qui fait partie du groupe des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) au même titre que la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) chez l'homme, l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), appelée aussi « maladie de la vache folle », ou d'autres pathologies humaines moins connues comme le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Schrinker et l'insomnie fatale familiale. Ces ESST se rencontrent également chez les ruminants sauvages (cerfs), les félidés (chats, tigres) et le vison. Ce qui distingue les ESST des autres encéphalopathies c'est leur caractère transmissible.

1.2 L'agent infectieux

La nature de (ou des) l'agent(s) responsable(s) des ESST n'a pas encore été identifiée, cet agent a été désigné sous l'appellation d'Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC) en raison de sa résistance à la chaleur, aux agents classiques de décontamination chimiques ou physiques et aux radiations. Il n'entraîne aucune réaction inflammatoire ni réponse immunitaire. Selon *Prusiner* (1982), l'agent infectieux de nature protéique PrP est une isoforme anormale de la protéine cellulaire PrP_c, exprimée par les cellules au niveau membranaire, appelée PrP_{sc} (PrP_{scrapie}) ou protéine prion (**proteinaceous infectious particle**).

L'interaction entre les deux isoformes serait impliquée dans le processus physiopathologique des ESST [PRUSINER, S., 1982 ; CAUGHEY, B., *et al.*, 1988] et conduirait à l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau des individus infectés. Certains auteurs nient cependant le caractère infectieux de la PrP_{sc} et considèrent l'accumulation de cette protéine modifiée comme un marqueur de la maladie. D'autres théories sur la nature des ATNC ont été développées dont celle d'une nucléoprotéine ; selon cette théorie un second élément serait indispensable à la transmission de la maladie : protéine ou acide nucléique [DICKINSON, A., *et al.*, 1988]. Les hypothèses sont nombreuses mais aucune ne satisfait l'ensemble des connaissances cliniques, biologiques et épidémiologiques [DORMONT, D., 1994].

1.3 Le tableau clinique

La tremblante est une maladie caractérisée par une longue période d'incubation (de 1 à 3 ans) suivie d'une phase clinique assez courte (1 mois à 1 an, 6 mois en moyenne) évoluant inéluctablement vers la mort de l'animal.

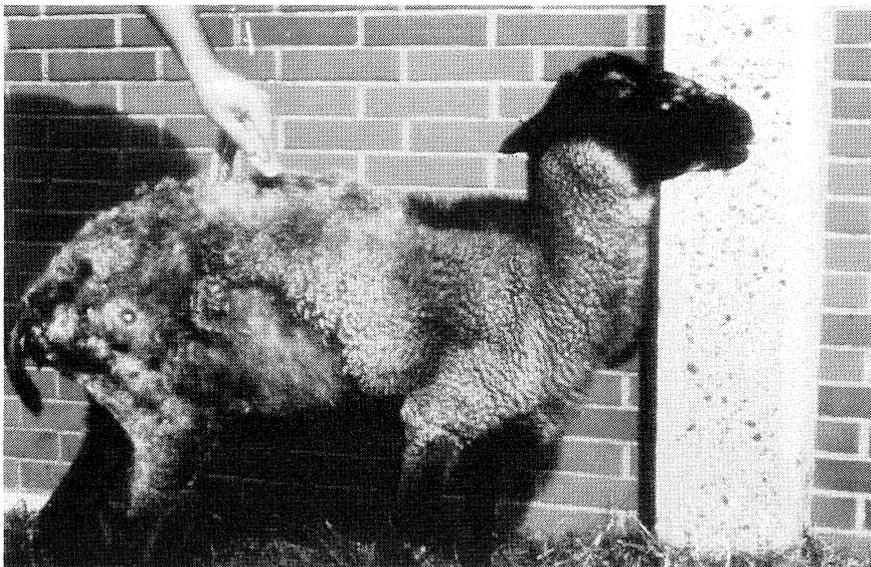


Photo 1 : Brebis Romanov en phase clinique de tremblante.

De nature neurologique, les symptômes varient en nombre et en intensité selon l'animal et la souche de l'agent infectieux. Les signes cliniques classiques sont : des troubles du comportement (perte de l'instinct grégaire, hyperexcitabilité, anxiété, agressivité), du prurit avec apparition de lésions cutanées et de pertes de laine dues au grattage (photo 1), des troubles moteurs (tremblements, défauts de posture, incoordination locomotrice, troubles de la miction). L'animal en phase terminale est maigre cachectique (photo 1) et reste en décubitus latéral. Il peut exister des formes atypiques de la maladie caractérisées par une paralysie sans prurit, ni tremblements [SCHELCHER, F., *et al.*, 1996].

1.4 La transmission de la maladie et son contrôle génétique

La transmission est principalement horizontale, elle se fait par voie orale (ingestion de placenta, pâture, moelle épinière, encéphale) [HOURRIGAN, J., *et al.*, 1979], l'existence d'une transmission verticale est très controversée, elle serait plutôt « latérale » c'est à dire qu'elle aurait lieu au moment de la naissance.

Il existe un contrôle génétique de la sensibilité à la tremblante ovine et il a été montré [HUNTER, N., *et al.*, 1989] que le gène majeur de sensibilité à la tremblante du mouton est étroitement lié, voire confondu, avec le gène *Prn-p* qui code pour la protéine PrP_c. Cinq codons de ce gène, parmi lesquels 3 ont une action sur la sensibilité à la tremblante, sont bien connus [ELSEN, J., *et al.*, 1999].

1.5 Les lésions

Les lésions macroscopiques sont liées au grattage, aux troubles locomoteurs et au décubitus et sont par conséquent peu spécifiques.

La contamination des tissus lymphoïdes périphériques est de règle au cours de la phase de dissémination dans l'organisme de l'agent de la tremblante et la présence de PrP_{sc} a été mise en évidence dans les plaques de Peyer, la rate et les amygdales [ANDREOLETTI, O., *et al.*, 2000]. Les lésions spongiformes de l'encéphale sont à l'origine des symptômes nerveux. Sur le plan histologique, on note une vacuolisation des neurones à l'origine de la spongiose, une perte

neuronale, le dépôt de plaques amyloïdes correspondant à une accumulation de PrP_{sc} et une multiplication des astrocytes. Des lésions microscopiques d'organes autres que le système nerveux central (glandes surrénales, hypophyse, rétine, muscle...) ont été décrites : elles ne s'accompagnent pas nécessairement d'une accumulation de protéines PrP_{sc} [HULLAND, T., 1958].

1.6 Le diagnostic

Le diagnostic est établi à partir de données épidémiologiques (ovins ayant des signes neurologiques dans un troupeau atteint) et des signes cliniques, pour les formes classiques. Le diagnostic classique et formel de la tremblante est obtenu *post-mortem* par l'histopathologie (mise en évidence de vacuolisations dans le système nerveux central).

D'autres méthodes permettent de réaliser le diagnostic de tremblante : l'immunocytochimie à partir d'échantillon des systèmes nerveux ou lymphoïdes [MILLER, J., *et al.*, 1993], l'inoculation à l'animal de laboratoire, l'infection *in vitro* de cellules permissives [MC KINLEY, M., *et al.*, 1991 ; KRISTENSSON, K., *et al.*, 1993]. Plus récemment, des diagnostics d'immunocytochimie basés sur la mise en évidence de PrP_{sc} ont été développés à partir de biopsies d'amygdales [IKEGAMI, Y., *et al.*, 1991 ; VAN KEULEN, L., *et al.*, 1996] prélevées sur des animaux vivants. Il n'existe à ce jour aucun test diagnostique réalisable en routine sur des animaux en phase pré-clinique, les ATNC n'induisant ni réaction immunogène, ni réaction inflammatoire détectable. Le développement d'un test diagnostique non invasif et précoce de la tremblante est donc un enjeu épidémiologique et physiopathologique majeur.

Les maladies à prion se traduisent par des altérations précoces du système nerveux associées à des perturbations des fonctions neuroendocriniennes : une hyperinsulinémie chez des hamsters expérimentalement infectés avec la souche 139 H de tremblante [CARP, R., *et al.*, 1990] et une atteinte du rythme circadien de sécrétion des corticoïdes dans l'insomnie fatale familiale humaine [PORTALUPPI, F., *et al.*, 1994] ont été décrites. Une étude menée au laboratoire, dans le cadre de l'identification d'un marqueur fonctionnel de la tremblante, a mis en évidence un syndrome d'hypercorticisme chez les brebis atteintes de tremblante [SCHELCHER, F., *et al.*, 1999 ; GAYRARD, V., *et al.*, 2000].

2 - LA FONCTION CORTICOSURRENALIENNE

2.1 La cortisolémie : production, transport et élimination du cortisol

Le cortisol, principal glucocorticoïde chez la brebis, est synthétisé par la zone fasciculée des glandes surrénales. La cortisolémie basale chez les ovins varie de 3,6 à 18 ng/mL. Chez les ovins, la sécrétion pulsatile de cortisol présente un rythme nyctéméral [MC NATTY, K., *et al.*, 1972]. Différents facteurs sont susceptibles de faire varier la cortisolémie, ce sont : le stade sexuel [BELL, M., *et al.*, 1991], la prise alimentaire, des situations comme le stress, l'exercice [ROSE, R., *et al.*, 1982].

Le transport du cortisol dans le secteur plasmatique est assuré par l'albumine, protéine qui a une forte capacité de fixation pour l'ensemble des stéroïdes mais une faible affinité et qui constitue un transporteur non spécifique, et la CBG (Corticosteroid Binding Globulin), protéine de transport spécifique appelée également transcortine. Cette dernière présente une faible capacité de liaison pour le cortisol (caractérisée par sa capacité maximale de liaison du cortisol, B_{max}), mais une forte affinité (caractérisée par sa constante de dissociation à l'équilibre K_d , qui correspond à la concentration de cortisol libre pour laquelle 50% des sites de fixation de la CBG sont occupés). La dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) ne se lie pas à la CBG de sorte qu'en présence des 2 molécules, la liaison du cortisol à la CBG n'est pas modifiée [BRIGHT, G., 1995].

Le cortisol existe ainsi sous 3 formes dans le secteur plasmatique : libre, liée à l'albumine et liée à la CBG. C'est la forme libre qui est biologiquement active mais elle est minoritaire tandis que la forme liée constitue une réserve rapidement mobilisable.

Le cortisol est rapidement éliminé de la circulation sanguine, principalement par inactivation hépatique, à la suite de conversions enzymatiques puis de conjugaisons qui le rendent plus hydrosoluble, le rein constitue le deuxième site majeur de métabolisme du cortisol [SCHNEIDER, J., *et al.*, 1952]. Les métabolites du cortisol sont excrétés dans la bile et les urines.

2.2 Le contrôle de la sécrétion de cortisol : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien comprend 3 étages ; (i) un étage central, l'hypothalamus, qui s'étend du tractus supra-optique aux corps mamillaires, et produit des hormones qui contrôlent les sécrétions du deuxième étage de ce complexe, (ii) l'adénohypophyse qui sécrète des hormones libérées directement dans la circulation générale, enfin (iii) les glandes surrénales organes cibles de certaines de ces hormones.

2.2.1 Stimulation de la sécrétion de cortisol par l'ACTH

Chez la brebis, la sécrétion de cortisol est totalement dépendante de la libération d'ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone ou Corticotropine) par les cellules corticotropes de la pars distalis de l'adénohypophyse. L'ACTH est un polypeptide de 39 acides aminés qui dérive d'un polypeptide précurseur de 265 acides aminés, la proopiomélanocortine ou POMC. La séquence N-terminale 1-24 de l'ACTH est commune à toutes les espèces et possède une activité biologique alors que la séquence C-terminale 25-39 est spécifique de chaque espèce. Comme celle du cortisol, la sécrétion d'ACTH est pulsatile, à chaque pic d'ACTH correspond un pic plasmatique de cortisol. L'action de l'ACTH sur le cortex surrénalien est double : elle stimule la synthèse des stéroïdes, notamment en inhibant la 11β -HSD, enzyme responsable de la conversion du cortisol en cortisone [WALKER, B., *et al.*, 1992], et joue un rôle trophique sur les glandes surrénales [KEMPPAINEN, R., *et al.*, 1985].

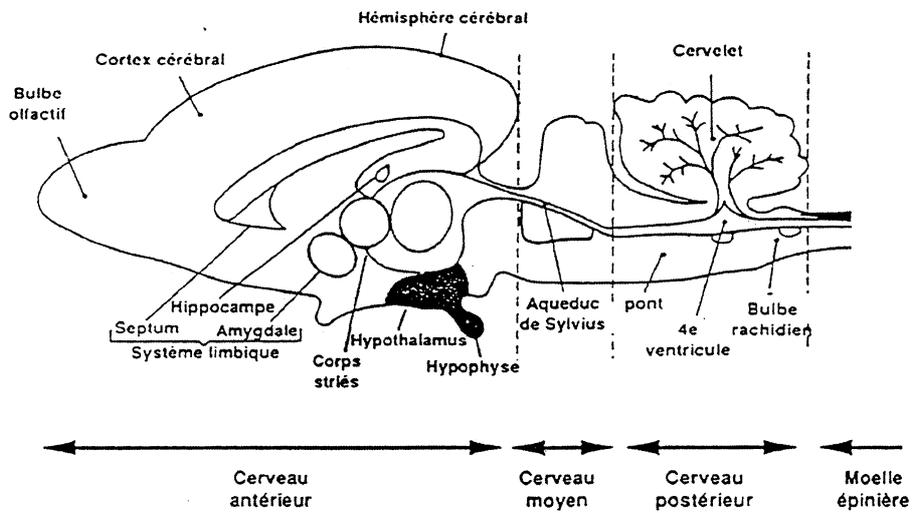


Schéma 1 : Coupe sagittale de l'encéphale montrant l'emplacement de l'hypothalamus et l'hypophyse (en noir).

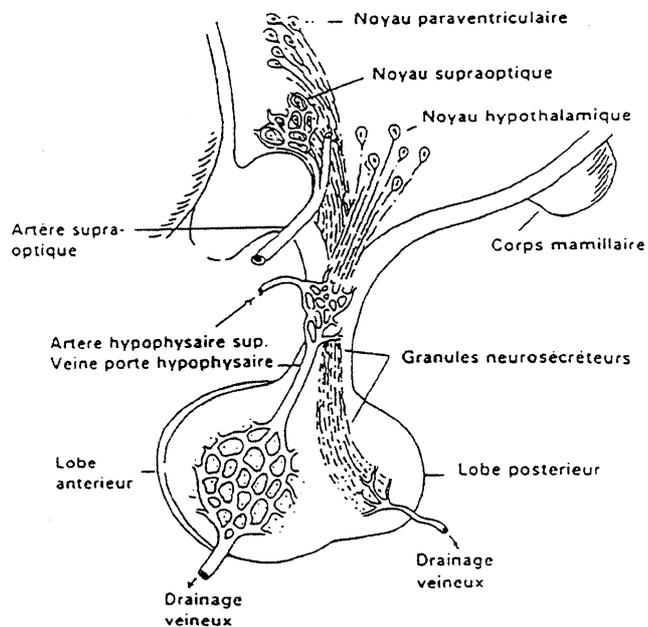


Schéma 2 : Représentation simplifiée de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

2.2.2 Contrôle hypothalamique

La régulation de la sécrétion d'ACTH par l'antéhypophyse est un processus multifactoriel faisant intervenir 2 principaux facteurs hypothalamiques : le CRF (Corticotropin-Releasing Factor ou corticolibérine), hormone polypeptidique de 41 acides aminés, et l'AVP (Arginine VasoPressine), nonapeptide. Le CRF est produit par les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire qui contient 2 types de neurones à CRF également représentés : les neurones colocalisant l'AVP et le CRF, et les neurones à CRF [WHITNALL, M., *et al.*, 1987]. Les axones de ces neurones se projettent dans la zone externe de l'éminence médiane où les deux peptides sont libérés dans des capillaires à partir desquels le sang est drainé dans les vaisseaux portes hypothalamo-hypophysaire qui déchargent leur contenu en neurohormones dans les capillaires de l'adénohypophyse. L'AVP est essentiellement synthétisée dans les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires qui envoient des terminaisons dans la neurohypophyse et participent également à la régulation des sécrétions d'ACTH. Chez la brebis, la composante physiologique majeure de la régulation des sécrétions basales d'ACTH est le CRF [GUILLAUME, V., *et al.*, 1992]. L'AVP jouerait un rôle dans la réponse de l'axe corticotrope à un stress mais ne participerait pas au contrôle des sécrétions basales de cortisol et d'ACTH [MC FARLANE, A., *et al.*, 1995]. D'autres hormones sont capables d'agir sur la sécrétion d'ACTH, ce sont l'ocytocine, l'angiotensine II, l'adrénaline.

2.2.3 Rétrocontrôle négatif du cortisol

Le cortisol exerce un contrôle négatif sur sa propre sécrétion [KELLER-WOOD, M., *et al.*, 1984] au niveau hypophysaire (contrôle des sécrétions d'ACTH), hypothalamique (contrôle des sécrétions de CRF et AVP) et extra-hypothalamique (action sur des systèmes neuronaux qui ont des afférences hypothalamiques). Ainsi, dans les conditions physiologiques, l'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, induit une inhibition des sécrétions d'ACTH, qui est responsable de la suppression des sécrétions de cortisol. L'administration de dexaméthasone est réalisée dans le cadre de tests d'exploration fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien afin de discriminer l'origine surrénalienne ou hypophysaire d'un dysfonctionnement surrénalien [FELDMAN, E., *et al.*, 1996].

Il existe également un contrôle nerveux de la fonction corticotrope qui fait intervenir les systèmes adrénergiques, GABA-ergiques, cholinergiques, 5-hydroxytryptaminergiques, opioïdiques et dopaminergiques [JENNY, M., *et al.*, 1977].

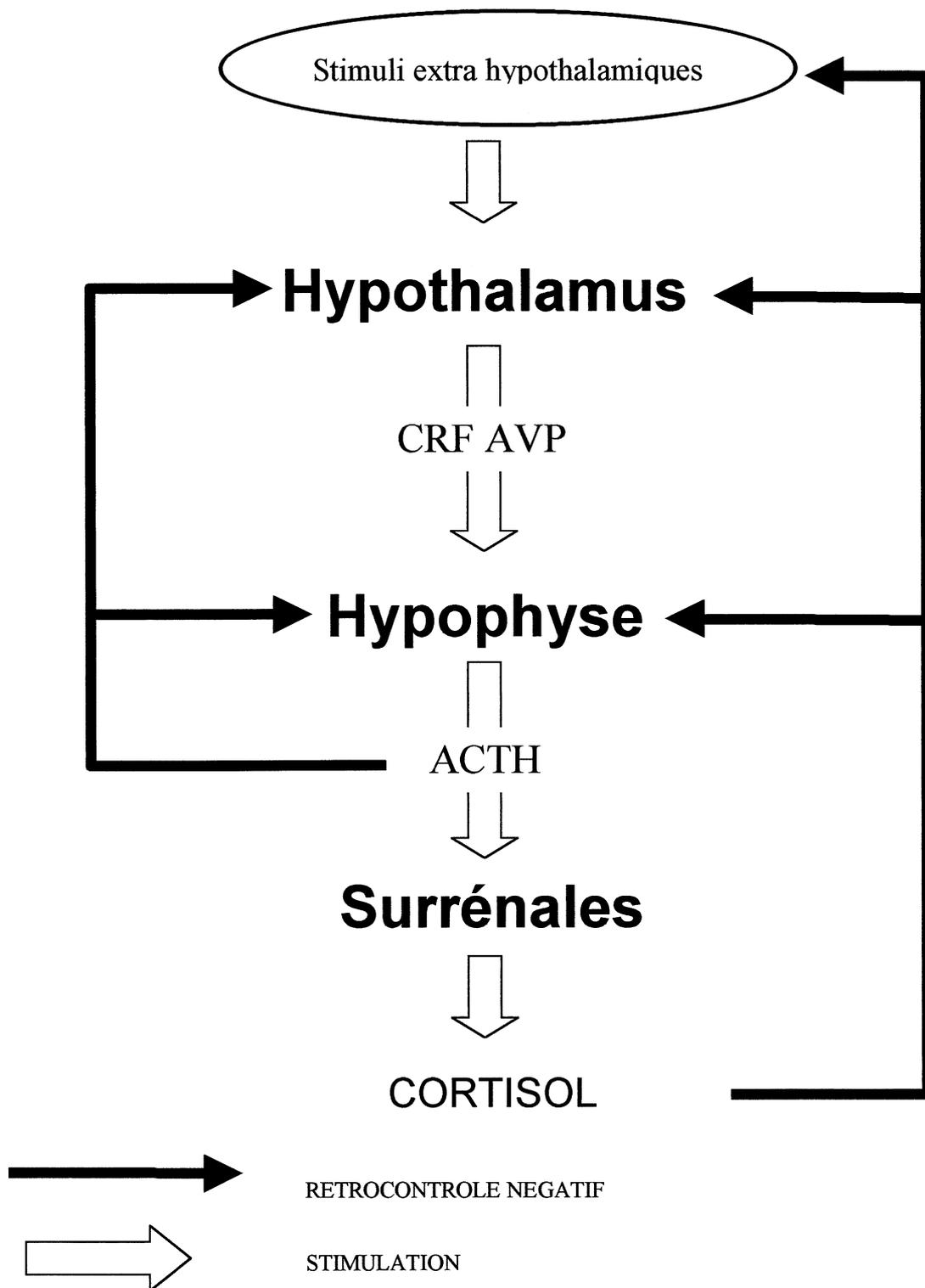


Schéma 3 : Représentation schématique du rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien.

3 – PROBLEMATIQUE

L'hypercortisolémie des brebis atteintes de tremblante a été attribuée à une augmentation de la production de cortisol [TOURON, C., 2001], les mécanismes d'élimination du cortisol ne sont pas perturbés par la maladie. La tremblante est également à l'origine d'une diminution des capacités de transport du cortisol par la CBG [PICARD-HAGEN, N., *et al.*, 2000].

Chez la brebis atteinte de tremblante l'hypersecretion de cortisol pourrait résulter (i) d'une atteinte des systèmes de contrôle du système nerveux comprenant l'hypothalamus et/ou l'hypophyse ou (ii) d'une hyperactivité sécrétoire autonome des corticosurrénales. Compte tenu des altérations du système nerveux central (spongieuse, hyperastrocytose) la première hypothèse semble plus probable, mais la deuxième ne peut être écartée dans la mesure où une accumulation de PrP_{res} (forme résistante du prion à la protéinase K) a été mise en évidence dans les surrénales des hamsters infectés par une souche de tremblante [KIM, Y., *et al.*, 1988].

L'objectif de notre étude est d'identifier l'origine centrale ou périphérique de l'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons comparé les profils de concentration d'ACTH des brebis en phase clinique de tremblante à ceux des brebis saines (Expérience 1, première période).

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une exploration fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien à l'aide :

- (i) d'un test de freination à la dexaméthasone à faible dose (Expérience 1, deuxième période),
- (ii) d'épreuves dynamiques de stimulation, en étudiant la réponse des corticosurrénales à l'administration d'ACTH exogène (ACTH₁₋₂₄, tétracosactide). La réponse de l'hypophyse à une administration de CRF ovin a également été analysée (Expérience 2).

MATERIELS ET METHODES

1 - LES ANIMAUX

Les expériences ont été menées avec 6 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante, de race Manech, âgées de 1,5 an à 5 ans, non gestantes ou en tout début de gestation, de poids compris entre 27 et 48 kg.

Les brebis saines ont été incluses dans l'étude sur la base d'une absence de signes cliniques évocateurs de la maladie. Six mois après cette étude, les brebis saines n'ayant pas manifesté de symptôme évocateur de tremblante ont pu être considérées comme indemnes ou en phase préclinique de la maladie.

Le diagnostic de tremblante a été établi à partir de critères cliniques (prurit, troubles du comportement, incoordination locomotrice, tremblements), au moins 10 jours avant le début des expériences, il a été ensuite confirmé par l'examen histopathologique.

Les brebis ont été euthanasiées lorsqu'elles ont présenté des signes terminaux de tremblante, notamment le décubitus.

Les animaux ont été placés individuellement dans des cages à métabolisme et soumis à une photopériode contrôlée de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Ils ont reçu une ration quotidienne de concentrés ainsi que du foin à volonté et ont eu un libre accès à l'eau. Les brebis ont été habituées aux conditions expérimentales pendant au moins 14 jours avant le début de l'expérience.

2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL : 2 expériences

2.1 Expérience 1

L'objectif de la première expérience était (i) de comparer les profils des concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH des brebis atteintes de tremblante à ceux des brebis saines, (ii) d'examiner l'intégrité de l'axe hypophysosurrénalien impliqué dans le rétrocontrôle négatif du cortisol par une épreuve de freination à la dexaméthasone, (iii) de comparer la réponse des glandes surrénales à une administration de tétracosactide (ACTH₁₋₂₄, tétracosactide) entre des brebis atteintes de tremblante et des brebis saines.

L'expérience a été divisée en 2 périodes séparées par un intervalle de 24 heures.

2.1.1 Première période

Pendant la première période, des prélèvements sanguins ont été réalisés à 10 minutes d'intervalle pendant 4 heures, soit de 13h30 à 17h30. Les échantillons sanguins ont été placés immédiatement dans de la glace pilée.

2.1.2 Deuxième période

Au cours de la seconde période, les brebis ont été soumises successivement à un test de freination faible à la dexaméthasone et à un test de stimulation de la fonction corticotrope au tétracosactide. La dexaméthasone (Cortaméthasone[®], 0,01 mg/kg) et le tétracosactide (Synacthène immédiat[®], Ciba-Geigy, Rueil Malmaison, France, 5 µg/kg) ont été administrés par voie intraveineuse successivement à 6 heures d'intervalle. Les prélèvements sanguins ont été effectués avant l'administration de dexaméthasone (soit à 08h00) puis 3, 4 et 6 heures après l'administration. Immédiatement après le dernier prélèvement, les brebis ont reçu une injection de tétracosactide. Des prélèvements sanguins ont ensuite été réalisés aux temps 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, 150 et 210 minutes après l'administration d'ACTH₁₋₂₄.

Une brebis atteinte de tremblante a été euthanasiée après la réalisation de la première expérience.

2.2 Expérience 2

L'objectif de la deuxième expérience, réalisée 9 jours après la première expérience, était de comparer la réponse de l'hypophyse des brebis atteintes de tremblante à celle des brebis saines à une stimulation avec de la CRF ovine (oCRF, Corticotropin-Releasing Factor).

L'expérience a débuté à 13h00 : des prélèvements sanguins ont été effectués pendant 1 heure toutes les 30 minutes avant l'administration de oCRF (Sigma[®], 0,4 µg/kg) par voie intraveineuse qui a eu lieu à 14h00. Des prélèvements sanguins ont été réalisés aux temps 4, 8, 15, 30, 45, 60 minutes après l'administration de oCRF puis toutes les 15 minutes pendant les 2 heures suivantes et enfin aux temps 3,5, 4 et 5 heures après l'administration. Les échantillons ont été placés immédiatement dans de la glace pilée.

Les brebis atteintes de tremblante qui ont été incluses dans ce protocole ont été euthanasiées entre 12 jours et 4 mois après la fin de l'expérience.

3 - PRELEVEMENTS SANGUINS, TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET ADMINISTRATIONS

Les prélèvements sanguins et les administrations ont été effectués à l'aide de 2 cathéters (Hémocath 30, Vygon, Paris) placés respectivement dans les veines jugulaires gauche et droite, la veille de la réalisation des expériences. Ces cathéters étaient stériles, héparinés (Héparine Roche®), afin d'éviter toute obstruction par coagulation, et bouchés jusqu'au moment de la réalisation des prélèvements ou des administrations. Les cathéters ont été vérifiés avant chaque expérience.

3.1 Prélèvements sanguins et traitements des échantillons

Les prélèvements sanguins d'un volume de 5 mL destinés au dosage du cortisol ont été recueillis sur héparinate de sodium (20 µL pour 10 mL, soit 50 U), immédiatement mélangés par retournement et centrifugés durant 10 minutes à 1400 g et à +4°C. Les prélèvements sanguins destinés au dosage de l'ACTH ont été recueillis sur EDTA (10 mM) et benzamidine (7,2 mg / 5 mL de sang), immédiatement mélangés par retournement, placés dans de la glace et centrifugés à 700 g pendant 8 minutes, moins de 15 minutes après le moment du prélèvement. Les prélèvements sanguins destinés au dosage de oCRF ont été répartis dans des tubes de 5 mL avec EDTA (4%) et centrifugés à 700 g pendant 10 minutes.

Le plasma récupéré a été réparti en 2 fractions aliquotes de 2,5 mL dans des tubes cristal de 5 mL et immédiatement congelé à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages.

3.2 Administrations

Des volumes de 0,4 mL (0,4 mg) de dexaméthasone et de 1 mL (0,25 mg) de tétracosactide ont été administrés.

Le oCRF a été dissout dans une solution saline de 50 mg/mL contenant 2% de plasma ovin stérile et 1% de HCl à 0,001 M.

Après les différentes administrations, le cathéter a été rincé 3 fois avec du sang puis avec 5 mL de sérum physiologique hépariné.

Les personnes effectuant les différentes administrations ne participaient pas aux prélèvements afin d'éviter toute contamination accidentelle de ceux-ci par les produits précédemment injectés.

4 - HISTOLOGIE

Les brebis saines n'ont pas été euthanasiées mais placées en observation clinique. Les brebis atteintes de tremblante ont été euthanasiées, à la fin des expériences ou en début de décubitus, par injection intraveineuse de pentobarbital sodique® (Sanofi Santé Animale, Libourne, France – 10 mg/kg).

Les brebis euthanasiées ont été saignées puis décapitées ; l'encéphale a été prélevé et placé dans une solution de formol tamponnée à 10% dans du sérum physiologique pendant 3 semaines. Les différents tissus prélevés, comprenant l'obex et le pons, ont été déshydratés puis inclus dans de la paraffine, découpés selon des sections frontales de 2 µm d'épaisseur et colorés à l'hématoxyline, méthode classiquement utilisée.

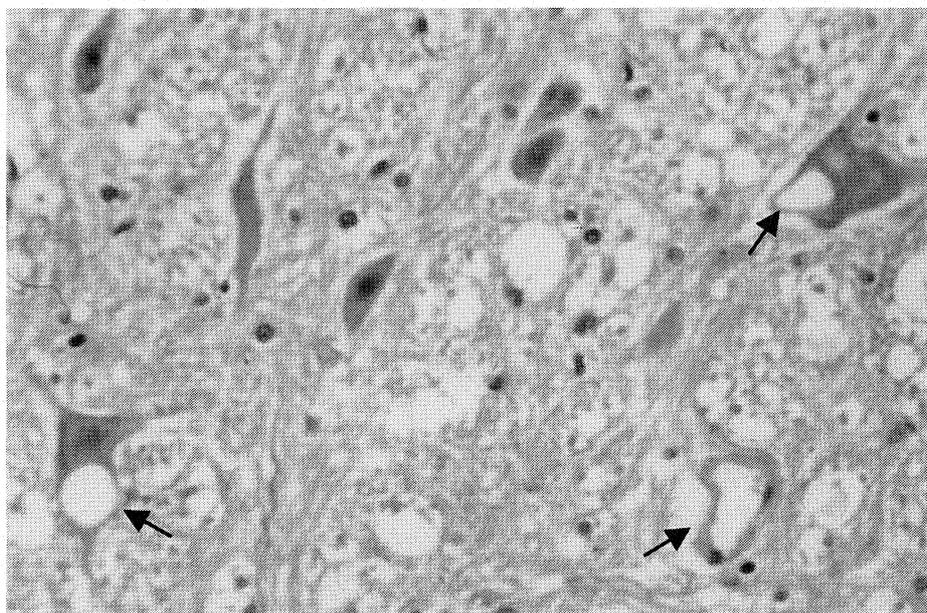


Photo 2 : Vue microscopique de la vacuolisation neuronale (flèches) chez une brebis atteinte de tremblante.
(x 400)

Le diagnostic de tremblante a été confirmé par l'identification de la vacuolisation des péricaryons et/ou des neuropiles dans au moins 3 noyaux de la substance grise (photo 2).

L'examen des glandes surrénales a mis en évidence l'hypertrophie des cellules de la zone fasciculée du cortex surrénalien.



Photo 3 : Coupe sagittale de surrénale de brebis saine d'un poids de 1,84 g (à droite) et de brebis atteinte de tremblante d'un poids de 2,92 g (à gauche).

5 - METHODE ANALYTIQUE

Les dosages hormonaux ont été réalisés par radio-immunologie (RIA). Le dosage du cortisol a été réalisé en utilisant une méthode adaptée de celle de Gomez Brunet et Lopez Sebastian [GOMEZ BRUNET, A., *et al.*, 1991].

La limite de quantification de ce dosage était de 4 ng/mL. Le coefficient de variation moyen intra-dosage pour 3 échantillons de plasma (4, 16, 32 ng/mL) était de 13%.

Les concentrations en ACTH ont été mesurées dans du plasma extrait à l'aide de polyéthylèneglycol, selon la méthode précédemment décrite par Usategui [USATEGUI, R., *et al.*, 1976]. Les concentrations plasmatiques en tétracosactide ont été mesurées en utilisant la même méthode de RIA à l'exception près que les molécules [¹²⁵I] ACTH₁₋₂₄ et ACTH₁₋₂₄ ont été utilisées à la place des molécules [¹²⁵I]ACTH₁₋₃₉ et ACTH₁₋₃₉.

Le oCRF circulant a été dosé par RIA dans des plasmas extraits à l'aide d'acétone [CARATY, A., *et al.*, 1990]. Le coefficient de variation intra-dosage était de 5% pour l'ACTH et le tétracosactide et de 6% pour le CRF. Les limites de détection de ces dosages étaient de 5 pg d'ACTH, 2,5 pg de tétracosactide et 10 pg de CRF par mL de plasma.

6 - ANALYSES PHARMACOCINETIQUES

6.1 Paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide et du oCRF

Les paramètres pharmacocinétiques du oCRF et du tétracosactide ont été calculés à l'aide de la cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques observées après les administrations respectives de tétracosactide et oCRF, en utilisant un programme d'analyse de régression non linéaire selon Multi [YAMAOKA, K., *et al.*, 1981]. Les concentrations plasmatiques ont été ajustées à l'équation polyexponentielle générale 1 :

$$\text{Equation 1} \quad C(t) = \sum_{i=1}^n Y_i \cdot \exp(-\lambda_i t)$$

où $C(t)$ représente la concentration plasmatique en tétracosactide au temps t (min), Y_i (ng/mL pour le tétracosactide et pg/mL pour le oCRF) le coefficient du i ème terme de l'exponentielle et λ_i (min^{-1}) le i ème terme exponentiel.

Les estimations initiales ont été obtenues en utilisant la méthode des résiduelles selon Gibaldi et Perrier [GIBALDI, M., *et al.*, 1982]. Dans cette méthode, les données ont été pondérées par un facteur égal à l'inverse du carré des concentrations estimées ($1/Y_i^2$). A partir d'un test de Fisher, l'équation 2 triexponentielle suivante a été sélectionnée :

$$\text{Equation 2} \quad C(t) = Y_1 \cdot \exp(-\lambda_1 t) + Y_2 \cdot \exp(-\lambda_2 t) + Y_3 \cdot \exp(-\lambda_3 t)$$

où $C(t)$ représente la concentration plasmatique en tétracosactide (ng/mL) ou en oCRF (pg/mL) au temps t (min), Y_1 , Y_2 , et Y_3 (ng/mL ou pg/mL) les coefficients préexponentiels, λ_1 , λ_2 et λ_3 les 1^{er}, et 2^{ème} et 3^{ème} exposants de l'équation correspondant aux phases de distribution et d'élimination. Par conséquent, les données ont été décrites selon un modèle tricompartmental ouvert avec l'élimination du tétracosactide (ou du oCRF) à partir du compartiment central.

Les paramètres (Y_1 , Y_2 , Y_3 , λ_1 , λ_2 et λ_3) ont été utilisés pour déterminer les constantes de transfert du compartiment central vers les compartiments périphériques (k_{12} , k_{21} , k_{13} et k_{31}) en accord avec les équations classiques [GIBALDI, M., *et al.*, 1982], où k_{12} et k_{13} (min^{-1}) sont les constantes de transfert de premier ordre du compartiment central vers les compartiments périphériques 2 et 3, k_{21} et k_{31} (min^{-1}) sont les constantes de transfert de premier ordre des compartiments périphériques 2 et 3 vers le compartiment central.

Le volume de distribution du compartiment central (V_c , mL/kg) a été calculé selon l'équation 3 :

Equation 3
$$V_c = \frac{\text{Dose}}{Y_1 + Y_2 + Y_3}$$

où $Y_1 + Y_2 + Y_3$ est la concentration initiale estimée.

Le volume de distribution à l'équilibre (V_{ss} , mL/kg) du tétracosactide et du oCRF a été obtenu à l'aide de l'équation 4 :

Equation 4
$$V_{ss} = V_c \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} + \frac{k_{13}}{k_{31}} \right)$$

avec k_{12} , k_{21} , k_{13} et k_{31} (les constantes de premier ordre traduisant les échanges entre les compartiments central et périphériques) et V_c définies précédemment.

La clairance plasmatique apparente du tétracosactide et du oCRF (Cl , mL/kg/min) a été calculée à l'aide de l'équation 5 :

Equation 5
$$Cl = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC}}$$

où AUC est l'aire sous la courbe obtenue grâce à l'équation 6 :

Equation 6
$$\text{AUC} = Y_1/\lambda_1 + Y_2/\lambda_2 + Y_3/\lambda_3$$

La demi-vie plasmatique ($T_{1/2}$, min) de la phase terminale a été calculée à l'aide de l'équation 7 :

Equation 7 $T_{1/2} = 0,693 / \lambda_3$

avec λ_3 , la pente de la dernière phase (l'élimination) définie précédemment et 0,693 le logarithme népérien de 2. Le temps de demi-vie est par conséquent le temps nécessaire pour que la concentration soit divisée par 2 pendant la phase terminale de décroissance des concentrations plasmatiques.

Le temps moyen de résidence (MRT, min) est le temps moyen passé par le tétracosactide ou le oCRF dans l'organisme, il a été calculé selon l'approche compartimentale grâce à l'équation 8 :

Equation 8
$$MRT = \frac{\int_0^{T_{last}} t C(t) dt}{\int_0^{T_{last}} C(t) dt}$$

avec t , le temps, $C(t)$, la concentration au temps t , T_{last} , le temps de la dernière concentration mesurable,

ce qui conduit à $MRT = (Y_1/\lambda_1^2 + Y_2/\lambda_2^2 + Y_3/\lambda_3^2)/(Y_1/\lambda_1 + Y_2/\lambda_2 + Y_3/\lambda_3)$

6.2 Evaluation de la réponse corticosurrénalienne à l'administration de tétracosactide

La réponse corticosurrénalienne à l'administration de tétracosactide a été évaluée en terme de taux de production de cortisol (PR_{CORT}) calculé selon l'équation 9 :

Equation 9 $PR_{CORT} = AUC_{CBGfree} (0-t_{last}) \times Cl_{CBGfree}$

où $Cl_{CBGfree}$ est la clairance plasmatique du cortisol non lié à la CBG précédemment déterminée chez ces brebis [GAYRARD, V., *et al.*, 2000],

et où $AUC_{CBG_{free}(0-t_{last})}$ est l'aire sous la courbe de la concentration de cortisol plasmatique non lié à la CBG en fonction du temps, calculée à partir de la méthode des trapèzes arithmétiques, de $t=0$ (heure de l'administration du tétracosactide) à t_{last} , temps de la dernière concentration mesurable. Les concentrations en cortisol total ont été converties en concentrations de cortisol non lié à la CBG (CBG_{free}) en utilisant l'équation 10 dérivée de l'équation 11.

Equation 10

$$CBG_{free} = \frac{[TOT - B_{max} - K_d(NS + 1)] + \sqrt{[K_d(NS + 1) - TOT + B_{max}]^2 + 4 \times TOT \times K_d}}{2}$$

où TOT est la concentration plasmatique de cortisol total mesurée :

Equation 11

$$TOT = B_{CBG} + CBG_{free}$$

$$TOT = B_{CBG} + F + NS \times F$$

$$TOT = \frac{B_{max} \times F}{K_d + F} + F (NS + 1)$$

où F est la concentration plasmatique en cortisol libre,

B_{CBG} est la concentration plasmatique en cortisol lié à la CBG,

NS est une constante de proportionnalité sans dimension caractérisant la liaison non spécifique du cortisol à l'albumine,

B_{max} est la capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG,

et K_d est la constante de dissociation à l'équilibre du cortisol lié à son transporteur la CBG ; elle correspond à la concentration de cortisol libre pour laquelle 50% des sites de fixation de la CBG sont occupés.

Les valeurs individuelles B_{max} , K_d et NS utilisées pour ces brebis sont celles précédemment déterminées par dialyse à l'équilibre [PICARD-HAGEN, N., *et al.*, 2000].

6.3 Réponse hypophysaire et corticosurrénalienne à l'administration de oCRF

Le taux de production de cortisol induit par l'administration de oCRF a été déterminé selon l'équation 10.

$AUC_{CBGfree(0-t_{last})}$ a été calculée à partir des données des concentrations en cortisol total d'abord converties en concentration de cortisol non lié à la CBG et ensuite corrigées en enlevant un niveau de base qui correspond à la concentration moyenne de cortisol non lié à la CBG observée pendant l'heure qui précède l'administration de oCRF.

Le taux de production d'ACTH induit par l'administration de oCRF a été estimé à l'aide de l'équation 12 :

Equation 12 $PR_{ACTH} = AUC_{ACTH(0-t_{last})} \times Cl_{t\acute{e}tra}$

où $AUC_{ACTH(0-t_{last})}$ est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques d'ACTH en fonction du temps, calculée à l'aide de la méthode des trapèzes arithmétiques, de $t=0$ (heure d'administration du oCRF) à t_{last} , heure de la dernière concentration mesurée.

Les concentrations d'ACTH observées après l'administration de oCRF ont été préalablement corrigées en retirant de ces valeurs un niveau de base correspondant à la valeur moyenne des concentrations plasmatiques d'ACTH obtenue pendant l'heure précédant l'administration de oCRF.

$Cl_{t\acute{e}tra}$ est la clairance plasmatique de tétracosactide précédemment définie par l'équation 5.

7 - ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics (version 5, STSC Inc., 1991). Une valeur de P inférieure à 0,05 permet de considérer le test comme significatif. Les concentrations en cortisol inférieures à la limite de quantification de l'expérience ont été arbitrairement fixées à 2 ng/mL. Le test non paramétrique unilatéral de Kruskal-Wallis a été utilisé dans l'analyse de l'effet de la tremblante sur les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH. L'effet de la tremblante sur les paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide et du oCRF a été estimé en utilisant une analyse de variance à 1 facteur. Le même test a été utilisé pour examiner l'effet de la tremblante sur les taux de production de tétracosactide et cortisol induits par l'administration de oCRF.

RESULTATS

Les résultats histologiques ont confirmé le diagnostic de tremblante grâce à la mise en évidence de la vacuolisation du système nerveux central.

1 - EXPERIENCE 1

1.1 Période 1

La figure 1 montre les variations temporelles individuelles des concentrations plasmatiques d'ACTH et de cortisol observées pendant 4 heures pour l'ensemble des brebis.

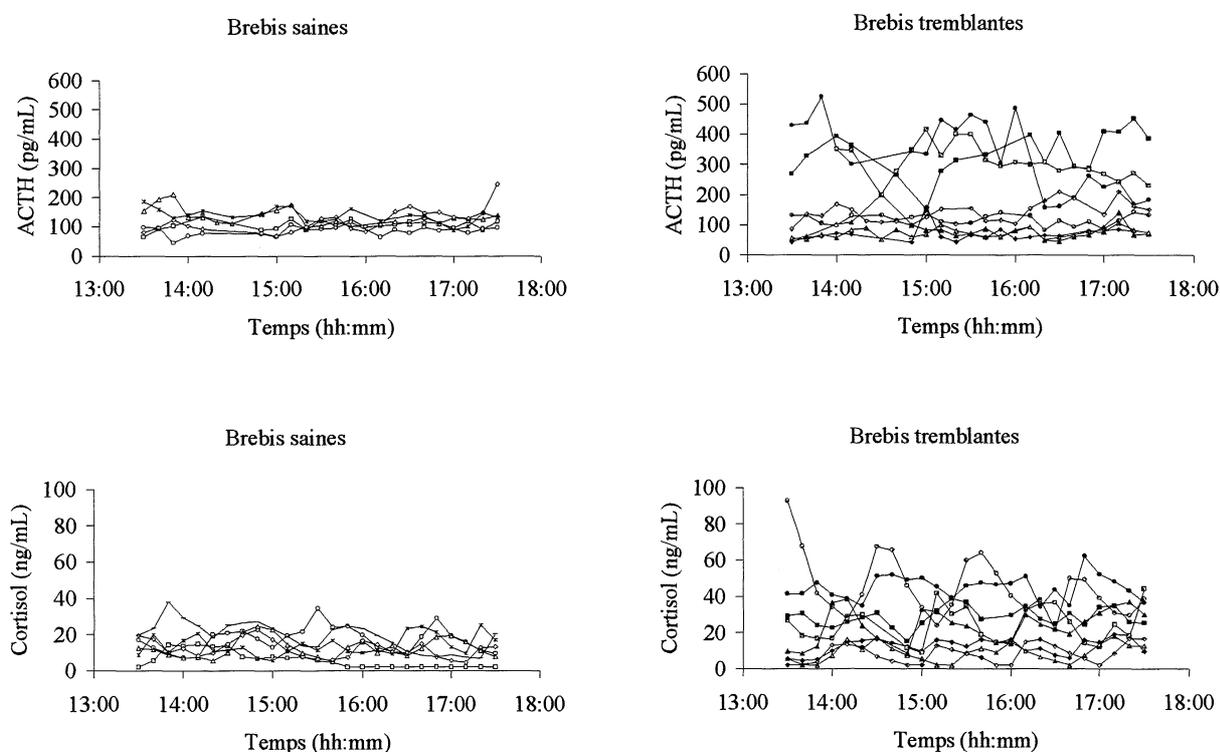


Figure 1 : Variations temporelles des concentrations plasmatiques d'ACTH et de cortisol évaluées toutes les 10 minutes pendant 4 heures chez des brebis saines (à gauche) et des brebis atteintes de tremblante (à droite).

Une simple observation de cette figure montre que les variations interindividuelles des concentrations plasmatiques moyennes d'ACTH des brebis atteintes de tremblante sont plus importantes que celles des brebis saines, les concentrations moyennes s'étendant de 68,7 à 335,5 pg/mL pour les brebis malades contre 85,7 à 137,1 pg/mL pour les brebis saines.

La moyenne des concentrations plasmatiques d'ACTH obtenues sur 4 heures a été significativement plus importante (Kruskal-Wallis unilatéral, $P < 0,05$) chez les brebis atteintes de tremblante ($177,2 \pm 123,5$ pg/mL) que chez les brebis saines ($116,4 \pm 32,5$ pg/mL).

De même, les concentrations plasmatiques moyennes de cortisol des brebis atteintes de tremblante observées pendant cette période ($24,5 \pm 16,4$ ng/mL) ont été significativement supérieures à celles observées chez les brebis saines ($13,4 \pm 7,3$ ng/mL, Kruskal-Wallis, $P < 0,01$).

1.2. Période 2

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques moyens décrivant la disposition du tétracosactide après une injection intraveineuse de tétracosactide à la dose de $5\mu\text{g/kg}$ chez 5 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante.

Paramètres	Brebis saines	Brebis tremblantes
$T_{1/2}$, min	$41,0 \pm 18,1$	$46,8 \pm 26,2$
V_c , mL/kg	$48,4 \pm 25,5$	$63,1 \pm 47,7$
V_{ss} , mL/kg	$65,6 \pm 21,0$	$92,7 \pm 51,5$
Cl, mL/(kg.min)	$8,3 \pm 1,7$	$8,7 \pm 3,6$
MRT, min	$7,3 \pm 0,9$	$10,0 \pm 5,6$

Les données ont été traitées en utilisant une équation triexponentielle et interprétées selon un modèle tricompartmental.

Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type. $T_{1/2}$ est le temps de demi-vie plasmatique de la phase terminale, V_c le volume du compartiment central, V_{ss} le volume de distribution à l'équilibre, Cl la clairance plasmatique calculée en divisant la dose de tétracosactide par l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en tétracosactide observées de $t = 0$ à $t = t_{\text{last}}$, MRT le temps moyen de résidence.

Aucune de ces différences n'est statistiquement significative (ANOVA, $P > 0,05$).

Six heures après l'administration de dexaméthasone ($0,01$ mg/kg), le cortisol et l'ACTH n'ont pas été détectés chez l'ensemble des brebis saines alors que les taux

plasmatiques en cortisol ont été supérieures à la limite de quantification du dosage chez 4 des 8 brebis atteintes de tremblante.

Les paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide (clairance plasmatique, $T_{1/2}$, V_c , V_{ss} , MRT) des brebis atteintes de tremblante n'ont pas été différents de ceux des brebis saines (tableau 1).

La figure 2 montre les variations temporelles des concentrations plasmatiques moyennes en cortisol total et en cortisol non lié à la CBG observées suite à l'administration de tétracosactide chez les brebis saines et atteintes de tremblante.

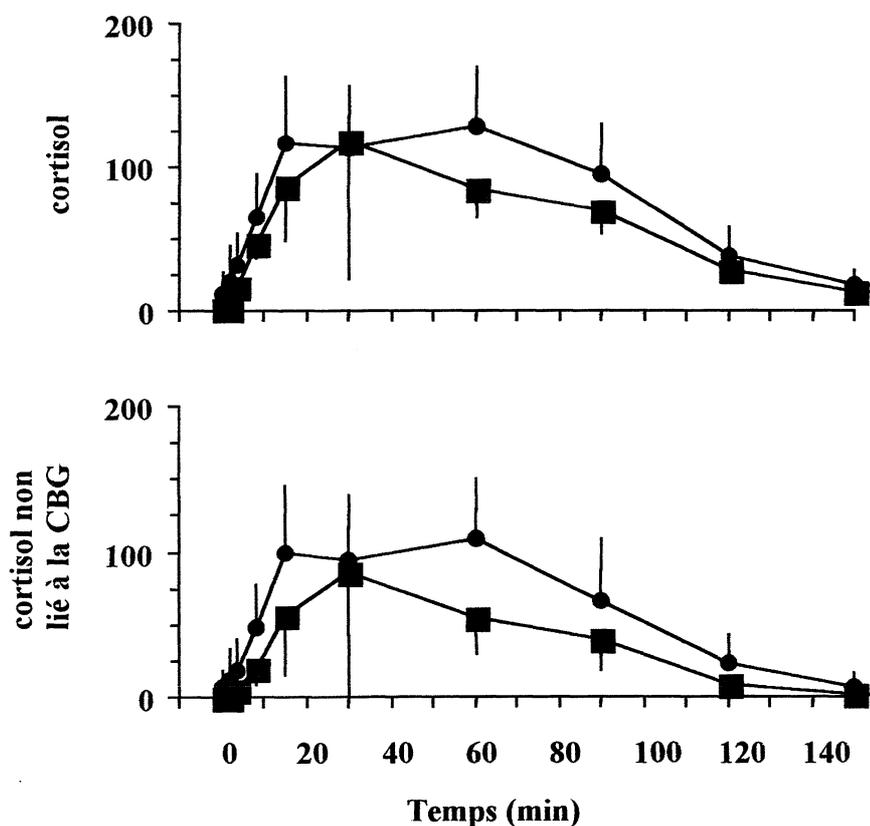


Figure 2 : Effet d'une administration intraveineuse de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tétracosactide sur les concentrations plasmatiques moyennes en cortisol total et en cortisol non lié à la CBG (en ng/mL) chez les brebis saines (symbole carré) et chez les brebis atteintes de tremblante (symbole rond).

L'observation de la figure montre que la réponse des brebis malades apparaît similaire à celle des brebis saines. Cependant, le taux de production moyen de cortisol obtenu après l'administration de tétracosactide chez les brebis atteintes de tremblante a été 2 fois plus important que celui des brebis saines ($297,0 \pm 69,6$ contre $147,4 \pm 76,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, ANOVA, $P < 0,01$).

2 - EXPERIENCE 2

Les paramètres pharmacocinétiques moyens du oCRF (Cl , $T_{1/2}$, V_c , V_{ss} , MRT) des brebis atteintes de tremblante n'ont pas été différents de ceux des brebis témoins (tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques moyens décrivant la disposition du oCRF après une administration intraveineuse de $0,4$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oCRF chez 5 brebis saines et 6 brebis atteintes de tremblante.

Paramètres	Brebis saines	Brebis tremblantes
$T_{1/2}$, min	$71,1 \pm 17,5$	$74,7 \pm 27,6$
V_c , mL/kg	$209,5 \pm 20,2$	$183,9 \pm 104,4$
V_{ss} , mL/kg	$488,7 \pm 91,3$	$394,2 \pm 72,8$
Cl , mL/(kg.min)	$5,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 2,0$
MRT, min	$82,1 \pm 18,1$	$63,3 \pm 17,3$

Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type. $T_{1/2}$ est le temps de demi-vie plasmatique de la phase terminale, V_c le volume du compartiment central, V_{ss} le volume de distribution à l'équilibre, Cl la clairance plasmatique calculée en divisant la dose de oCRF par l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en oCRF observées de $t = 0$ à $t = t_{last}$, MRT le temps moyen de résidence.

Aucune de ces différences n'est statistiquement significative (ANOVA, $P > 0,05$).

La figure 3 montre les variations temporelles des concentrations plasmatiques moyennes d'ACTH et de cortisol observées suite à l'administration de oCRF. Les taux de production moyens d'ACTH observés après l'administration de oCRF chez les brebis atteintes de tremblante ($29,0 \pm 23,3 \mu\text{g/kg}$) n'ont pas été significativement différents de ceux des brebis saines ($32,5 \pm 25,8 \mu\text{g/kg}$, ANOVA, $P > 0,05$). Les taux de production moyens de cortisol induits par la même dose iv de oCRF chez les brebis atteintes de tremblante ($214,4 \pm 171,3 \mu\text{g/kg}$) ont été supérieurs à ceux des brebis saines ($109,0 \pm 70,8 \mu\text{g/kg}$) mais cette différence n'a pas été statistiquement significative (ANOVA, $P > 0,05$).

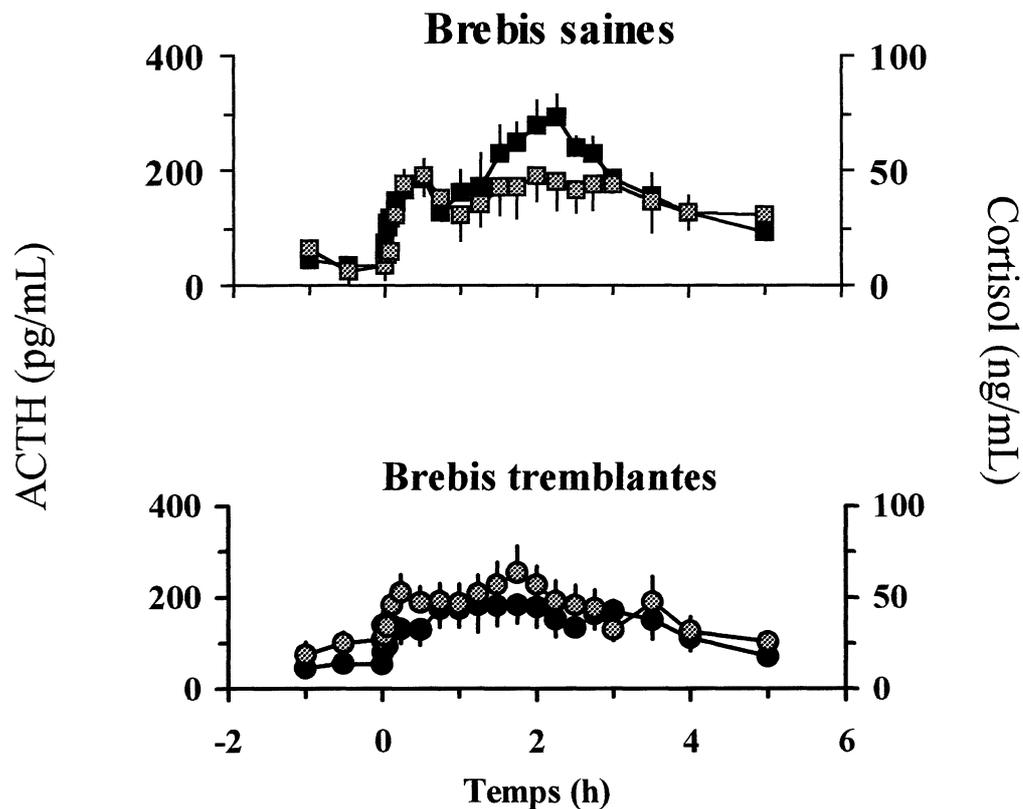


Figure 3 : Variations temporelles des concentrations plasmatiques d'ACTH (en noir) et de cortisol (en gris) observées pendant une période s'étendant de 1 heure avant jusqu'à 5 heures après l'administration intraveineuse de oCRF à la dose de $0,4 \mu\text{g/kg}$ chez les brebis saines et celles atteintes de tremblante.

DISCUSSION

Nous avons montré que l'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante est associé à une augmentation de la sécrétion d'ACTH (par un facteur 1,5) et de la réponse des corticosurrénales à une stimulation par le tétracosactide, ainsi qu'à une diminution de la réponse à un test de freination faible à la dexaméthasone. Ces résultats suggèrent que cette maladie à prion est à l'origine d'un syndrome d'hypercorticisme d'origine hypophysaire ou centrale.

L'hypercortisolémie des brebis atteintes de tremblante est en accord avec la stimulation de la fonction surrénalienne démontrée dans les études précédentes [SCHELCHER, F., *et al.*, 1999 ; GAYRARD, V., *et al.*, 2000] et avec l'augmentation anormale du poids des glandes surrénales observée chez les brebis naturellement atteintes de tremblante [BECK, E., *et al.*, 1964] ainsi que chez les souris [KIM, Y., *et al.*, 1988] et hamsters [CARP, R., *et al.*, 1990] [YE, X., *et al.*, 1996] expérimentalement infectés.

D'un point de vue physiopathologique, nos résultats suggèrent que la stimulation de l'activité surrénalienne des brebis atteintes de tremblante pourrait résulter du dommage cérébral causé par la tremblante, plutôt que d'une modification pathologique des surrénales. En effet, nous avons montré que les concentrations plasmatiques d'ACTH des brebis malades sont 1,5 fois plus importantes que celles observées chez les brebis saines. Si l'on considère que la disposition des paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide reflète celle des paramètres de l'ACTH naturelle, nous pouvons conclure que la sécrétion d'ACTH a été augmentée par un facteur 1,5 chez les brebis malades. Une autre étude avait montré que la sécrétion de cortisol était multipliée par 5 chez ces mêmes brebis [GAYRARD, V., *et al.*, 2000].

La différence entre les augmentations du niveau de production de cortisol et d'ACTH chez les brebis atteintes de tremblante peut être en partie expliquée par la réponse accrue du cortex surrénalien à une stimulation par le tétracosactide. En effet, nous avons montré que l'administration de tétracosactide induirait une augmentation de la production de cortisol chez les brebis malades 2 fois supérieure à celle des brebis saines. L'augmentation de la réponse des corticosurrénales au tétracosactide pourrait être la conséquence de l'hypersecretion chronique d'ACTH qui a des effets trophiques sur les glandes surrénales en augmentant leur équipement en enzymes impliquées dans la biosynthèse du cortisol. Ainsi l'augmentation de la réponse des surrénales au tétracosactide pourrait refléter l'hypertrophie des cellules de la zone fasciculée du

cortex surrénalien mise en évidence chez les brebis malades. La sensibilité accrue des cellules de la corticosurrénale à l'action du tétracosactide des brebis atteintes de tremblante pourrait également impliquer un effet positif de l'hormone sur ses propres récepteurs ou même du cortisol sur ces mêmes récepteurs [PICARD-HAGEN, N., *et al.*, 1997].

Enfin, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que des mécanismes de régulation extérieurs à l'hypophyse puissent participer au maintien de hauts niveaux de cortisol plasmatique. En effet, une discordance entre les taux plasmatiques d'ACTH et les concentrations élevées en glucocorticoïdes a été décrite par Bornstein [BORNSTEIN, S., *et al.*, 1999], de même l'activation des systèmes catecholaminergiques serait capable de compenser l'effet de rétroaction négative des glucocorticoïdes [LIU, J.P., *et al.*, 1991].

Le test de freination à la dexaméthasone à faible dose a induit une inhibition des sécrétions d'ACTH et de cortisol chez les brebis saines. Ces sécrétions n'ont pas été supprimées chez 4 brebis atteintes de tremblante ; trois de ces brebis malades ont par ailleurs présenté les valeurs les plus élevées des concentrations plasmatiques en ACTH. Ces résultats indiquent qu'une réduction de la sensibilité du système nerveux central au rétrocontrôle négatif du cortisol sans altération de l'étage hypophysaire pourrait expliquer à la fois l'action partielle de la dexaméthasone et le maintien de la sécrétion hypophysaire de l'ACTH chez les brebis atteintes de tremblante.

L'absence d'effet de la dexaméthasone chez la moitié des brebis atteintes de tremblante pourrait être expliquée par une sensibilité insuffisante du test de freination liée à la différence des sites d'action du cortisol et de la dexaméthasone impliqués dans l'exercice du rétrocontrôle. En effet, de nombreuses données expérimentales suggèrent que la dexaméthasone et les corticoïdes endogènes présentent des sites préférentiels d'action différents. La dexaméthasone systémique agirait principalement au niveau de l'hypophyse alors que les corticoïdes naturels exerceraient un rétrocontrôle au niveau central [DE KLOET, E.R., *et al.*, 1974]. De plus, l'absence d'effet de la dexaméthasone sur certaines brebis atteintes de tremblante pourrait être expliquée par les résultats d'une étude récente réalisée sur des souris transgéniques qui a montré que la pénétration de la dexaméthasone dans le système nerveux central est faible, contrairement aux glucocorticoïdes naturels, en raison de l'action d'une glycoprotéine, la *mdr1A-P*, au niveau de la barrière hémato-méningée qui exclue la dexaméthasone du système nerveux central. Ces observations confortent le concept selon lequel le site d'action de la dexaméthasone est hypophysaire plutôt que central, en ce qui

concerne le rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien [MEIJER, O., *et al.*, 1998].

La diminution de sensibilité du système nerveux central au rétrocontrôle négatif du cortisol pourrait résulter d'une diminution de la perméabilité de la barrière hémato-méningée du système nerveux central au cortisol, ou d'une diminution du « shuttle cortisone-cortisol », la cortisone étant un métabolite inactif. L'interconversion cortisol-cortisone est contrôlée par deux isoformes de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD). La 11 β -HSD1 est l'isoforme qui, en temps normal, amplifie l'action du cortisol au niveau du système nerveux central, grâce à son activité réductase, elle constitue l'unique étape du catabolisme du cortisol détectée dans le cerveau [MIYABO, S., *et al.*, 1973]. Une altération de l'activité de cette enzyme pourrait expliquer l'inefficacité du rétrocontrôle négatif du cortisol au niveau central. Parmi les molécules endogènes, l'insuline est capable d'inhiber cette enzyme *in vitro* [LIU, Y., *et al.*, 1996] or une hyperinsulinémie a été décrite chez le hamster expérimentalement infecté par la tremblante [CARP, R., *et al.*, 1990] et récemment une étude au laboratoire a montré une hyperinsulinémie chez la brebis atteinte de tremblante (résultats non publiés).

L'administration de oCRF a stimulé la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse provoquant une augmentation de la production de cortisol à la fois chez les brebis saines et chez les brebis atteintes de tremblante. La réponse de l'hypophyse au oCRF n'a pas été modifiée par la maladie à prion alors que la stimulation des sécrétions surrénaliennes semble être plus importante chez les brebis atteintes de tremblante. Comme cela a été démontré pour le cortisol [GAYRARD, V., *et al.*, 2000], les paramètres pharmacocinétiques du tétracosactide et du oCRF n'ont pas été affectés par la maladie ce qui confirme que le dysfonctionnement des surrénales causé par la tremblante n'implique pas une altération des processus d'élimination.

Nos résultats suggèrent que la tremblante pourrait induire une série d'adaptations de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, résultant d'un état réfractaire partiel ou total au cortisol, reflété par le maintien de la sécrétion d'ACTH et la réduction de la réponse à la dexaméthasone. La résistance au cortisol induite par la tremblante pourrait impliquer 2 mécanismes (i) une augmentation de la sécrétion d'arginine vasopressine (AVP) par les neurones magnocellulaires localisés dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique, qui pourrait expliquer l'absence d'effet supprimeur du cortisol sur la sécrétion d'ACTH, la sécrétion d'AVP étant moins sensible au rétrocontrôle négatif du cortisol, [BILEZIKJIAN, L.,

et al., 1987] et/ou (ii) l'augmentation de la sécrétion de CRF et/ou d'AVP par les neurones parvocellulaires localisés dans les noyaux paraventriculaires, qui pourrait résulter d'une altération du rétrocontrôle négatif du cortisol. En accord avec la première hypothèse, une hypertrophie fonctionnelle du système neurosécrétoire supraoptico-infundibulaire a été mise en évidence chez les brebis naturellement atteintes par la tremblante [PARRY, H., *et al.*, 1973]. La seconde hypothèse est confortée par l'augmentation du nombre de neurones à CRF de l'hypothalamus démontrée dans le modèle expérimental des hamsters infectés avec la souche 139H de tremblante [YE, X., *et al.*, 1994].

Quelle que soit son origine, le syndrome d'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante soulève la question des conséquences d'une surexposition chronique du système nerveux central au cortisol. Tout en possédant un effet protecteur [AISEN, P., *et al.*, 1998] qui réduirait la sensibilité à la tremblante [OUTRAM, G., *et al.*, 1974 ; GRILLI, M., *et al.*, 1999], le cortisol pourrait exacerber le lent processus de neurodégénération impliqué dans la maladie à prion, par des effets délétères retrouvés dans le cerveau des rongeurs [SAPOLSKY, R., 1996] en corrélation avec le nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes des structures concernées [MC EWEN, B., 1992]. D'un autre côté, un effet inhibiteur plus général de la surexposition au cortisol sur le système immunitaire des animaux infectés pourrait aider à expliquer l'absence d'une réponse immunitaire détectable observée dans la maladie à prion [SCHREUDER, B., 1994].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, les résultats de la présente expérience montrent que le syndrome majeur d'hypercorticisme des brebis naturellement atteintes de tremblante est associé à une augmentation de la sécrétion d'ACTH, à une augmentation des capacités sécrétoires du cortex surrénalien et à une diminution de la sensibilité du système nerveux central au rétrocontrôle négatif du cortisol. La sécrétion d'ACTH a été augmentée chez les brebis malades malgré un taux élevé de sécrétion de cortisol suggérant une atteinte des systèmes neuronaux impliqués dans le rétrocontrôle négatif du cortisol plutôt que d'un dysfonctionnement surrénalien.

Ces résultats montrent que l'origine du syndrome d'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante est probablement hypophysaire ou centrale. Les mécanismes impliqués pourraient être analysés par différentes approches méthodologiques : la quantification des neurones hypothalamiques au CRF et à l'AVP par immunocytochimie, ou l'évaluation des concentrations en CRF et AVP du système porte hypothalamo-hypophysaire des brebis atteintes de tremblante. La détermination du rapport des concentrations en cortisol et cortisone dans le liquide céphalo-rachidien pourrait également contribuer à la compréhension des mécanismes responsables de la réduction de la sensibilité du système nerveux central au rétrocontrôle négatif du cortisol.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mme GALEA épouse GRANDJEAN Jessie, Anne, Hélène
a été admis(e) sur concours en : 1995
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 8 juillet 1999
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, Véronique GAYRARD, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
déclare que j'ai lu la thèse de :
Mme GALEA épouse GRANDJEAN Jessie, Anne, Hélène
intitulée :
Exploration fonctionnelle de l'axe corticotrope de la brebis atteinte de tremblante
et que je prends la responsabilité de l'impression.

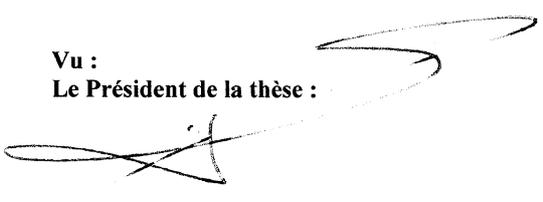
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**


Docteur Véronique GAYRARD

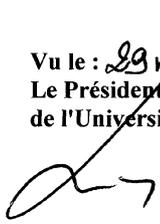
**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**


Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**


Professeur Jean PARINAUD

**Vu le : 29 mai 2009
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**


Professeur R. BASTIDE

BIBLIOGRAPHIE

AISEN, P. and PASINETTI, G. Glucocorticoids in Alzheimer's disease. *Drugs and Aging*, 1998, **12**, 1 - 6.

ANDREOLETTI, O., BERTHON, P., MARC, D., SARRADIN, P., GROSCLAUDE, J., VAN KEULEN, L., SCHELCHER, F., ELSESEN, J. and LANTIER, F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 2000, **81**, 3115 - 3126.

BECK, E., DANIEL, P. and PARRY, H. Degeneration of the cerebellar and hypothalamo-neurohypophysial systems in sheep with scrapie and its relationship to human system degenerations. *Brain*, 1964, **87**, 153 - 176.

BELL, M., WOOD, C. and KELLER-WOOD, M. Influence of reproductive state on pituitary-adrenal activity in the ewe. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1991, **8**, 2, 245 - 254.

BILEZIKJIAN, L., BLOUNT, A. and VALE, W. The cellular actions of vasopressin on corticotrophs of the anterior pituitary: resistance to glucocorticoid action. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1987, **1**, 451 - 458.

BORNSTEIN, S. and CHROUSOS, G. Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH mediated regulation of the adrenal cortex : neural and immune inputs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, **84**, 1729 - 1736,

BRIGHT, G. Corticosteroid-Binding Globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, **80**, 770 - 775.

CARATY, A., GRINO, M., LOCATELLI, A., GUILLAUME, V., BOUDOURESQUE, F., CONTE-DEVOLX, B. and OLIVER, C. Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophyseal portal blood of conscious, unrestrained rams. *J. Clin. Invest.*, 1990, **85**, 1716 - 1721.

CARP, R., KIM, Y. and CALLAHAN, S. Pancreatic lesions and hypoglycemia-hyperinsulinemia in scrapie-infected hamsters. *J. Infect. Dis.*, 1990, **161**, 462 - 466.

CAUGHEY, B., RACE, R. and CHESEBRO, B. Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J. Gen. Virol.*, 1988, **69**, 711 - 716.

DE KLOET, E. R., VAN DER VIES, J. and DE WIED, D. The site of the suppressive action of dexamethasone on pituitary- adrenal activity. *Endocrinology*, 1974, **94**, 1, 61-73.

DORMONT, D. Les agents transmissibles non conventionnels ou prions. *Rev. Prat.*, 1994, **44**, 7, 882 - 887.

ELSESEN, J., AMIGUES, Y., SCHELCHER, F., DUCROCQ, V., ANDREOLETTI, O., EYCHENNE, F., VU TIEN KHANG, J., POIVEY, J., LANTIER, F. and LAPLANCHE, J. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.*, 1999, **144**, 431 - 445.

FELDMAN, E., NELSON, R. and FELDMAN, M. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1996, **209**, 4, 772 - 775.

GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., GRINO, M., SAUZE, N., GRANDJEAN, C., GALEA, J., ANDREOLETTI, O., SCHELCHER, F. and TOUTAIN, P. Major hypercorticism is an endocrine feature of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology*, 2000, **141**, 988 - 994.

GIBALDI, M. and PERRIER, D. Pharmacocinetics, ed 2. New York, Marcel Dekker, 1982.

GOMEZ BRUNET, A. and LOPEZ SEBASTIAN, A. Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 1991, **26**, 251 - 268.

GRILLI, M. and MEMO, M. Nuclear factor- κ B /Rel proteins a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, **57**, 1 - 7.

GUILLAUME, V., CONTE-DEVOLX, B., MAGNAN, E., BOUDOURESQUE, F., GRINO, M., CATALDI, M., MURET, L., PRIOU, A., DEPREZ, P., FIGAROLI, J. and OLIVER, C. Effect of chronic active immunization anti-corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal function in the sheep. *Am. J. Physiol.*, 1992, **130**, 4, 2291 - 2298.

HOURRIGAN, J., KLINGSPORN, A., CLARK, W. and DECAMP, M. Epidemiology of scrapie in United States. In: S. PRUSINER and W. HADLOW, Slow transmissible diseases of the nervous system : New-York, Academic Press, 1979, 331 - 356.

HULLAND, T. The skeletal muscle of sheep affected with scrapie. *J. Comp. Pathol.*, 1958, **68**, 264 - 274.

HUNTER, N., FOSTER, J., DICKINSON, A. and HOPE, J. Linkage of the gene for the scrapie associated fibril protein (PrP) of the Sip gene in Cheviot sheep. *Vet. Rec.*, 1989, **124**, 364 - 366.

IKEGAMI, Y., ITO, M., ISOMURA, E., MOMOTANI, E., SASAKI, K., MURAMATSU, Y., ISHIGURO, N. and SHINAGAWA, M. Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 271 - 275.

JENNY, M. and VALLOTTON, M. Ch 4. Le cortex surrénalien. In : *Physiologie humaine*, meyer P (Ed), Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1977, 330 - 342.

KELLER-WOOD, M. and DALLMAN, M. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Reviews*, 1984, **5**, 1, 1 - 24.

KEMPPAINEN, R., THOMPSON, F., LORENZ, M. and BROWN, J. Effects of continuous α (1-24)ACTH infusion in the dog. *Hormon. Metabol. Res.*, 1985, **17**, 58 - 62.

KIM, Y., CARP, R., CALLAHAN, S. and WISNIEWSKY, H. Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1988, **189**, 21 - 27.

KRISTENSSON, K., FEUERSTEIN, B., TARABOULOS, A., HYUN, W., PRUSINER, S. and DE ARMOND, S. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology*, 1993, **43**, 2335 - 2341.

LIU, J. P., CLARKE, I. J., FUNDER, J. W. and ENGLER, D. Evidence that the central noradrenergic and adrenergic pathways activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the sheep. *Endocrinology*, 1991, **129**, 1, 200-209.

LIU, Y., NAKAGAWA, T., NASUDA, K., SAEGUSA, H. and IGARASHI, Y. Effect of growth hormone, insulin and dexamethasone on 11β -hydroxysteroid dehydrogenase activity on a primary culture of rat hepatocytes. *Life Science*, 1996, **59**, 3, 227 - 234.

MC EWEN, B. Re-examination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging. *Prog. Brain Res.*, 1992, **93**, 365 - 381.

MC FARLANE, A., COGHLAN, J., TRESHAM, J. and WINTOUR, E. Corticotropin-releasing factor alone, but not arginine vasopressin alone, stimulates the release of adrenocorticotropin in the conscious intact sheep. *Endocrinology*, 1995, **136**, 5, 1821 - 1827.

MC KINLEY, M., TARABOULOS, A., KENAGA, L., SERBAN, D., STIEBER, A., DE ARMOND, S., PRUSINER, S. and GONATAS, N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.*, 1991, **65**, 622 - 630.

MC NATTY, K., CASHMORE, M. and YOUNG, A. Diurnal variation in plasma cortisol levels in sheep. *J. Endocrinol.*, 1972, **54**, 361 - 362.

MEIJER, O., DE LANGE, E., BREIMER, D., DE BOER, A., WORKEL, J. and DE KLOET, E. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology*, 1998, **139**, 1789 - 1793.

MILLER, J., JENNY, A., TAYLOR, W., MARSH, R. and RUBENSTEIN, R. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 309 - 316.

MIYABO, S., KISHIDA, S. and HISADA, T. Metabolism and conjugation of cortisol by various dog tissues *in vitro*. *J. Steroid. Biochem.*, 1973, **4**, 567 - 576.

OUTRAM, G., DICKINSON, A. and FRASER, H. Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration. *Nature*, 1974, **249**, 855 - 856.

PARRY, H. and LIVETT, B. A new hypothalamic pathway to the median eminence containing neurophysin and its hypertrophy in sheep with natural scrapie. *Nature*, 1973, **242**, 63 - 64.

PICARD-HAGEN, N., GAYRARD, V., ALVINERIE, M., LAROUTE, V., TOURON, C., ANDREOLETTI, O. and TOUTAIN, P. Naturally occurring scrapie is associated with a lower CBG binding capacity in ewes. *J. Endocrinol.*, 2000, **165**, 527 - 532.

PICARD-HAGEN, N., PENHOAT, A., HUE, D., JAILLARD, C. and DURAND, P. Glucocorticoids enhance corticotropin receptor mRNA levels in ovine adrenocortical cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 1997, **19**, 29 - 36.

PORTALUPPI, F., CORTELLI, P., AVONI, P., VERGNANI, L., CONTIN, M., MALTONI, P., PAVANI, A., SFORZA, E., UBERTI, E., GAMBETTI, P. and LUGARESI, E. Diurnal blood pressure variation and hormonal correlates in fatal familia insomnia. *Hypertension*, 1994, **23**, 569 - 576.

PRUSINER, S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216**, 136 - 144.

ROSE, R. and SAMPSON, D. Changes in certain metabolic parameters in horses associated with food deprivation and endurance exercise. *Res. Vet. Sci.*, 1982, **32**, 198 - 202.

SAPOLSKY, R. Why stress is bad for your brain? *Science*, 1996, **273**, 749 - 750.

SCHELCHER, F., ANDREOLETTI, O. and CABANIE, P. La tremblante des ovins. *Point Vet.*, 1996, **28**, 179, 661 - 666.

SCHELCHER, F., PICARD-HAGEN, N., LAROUTE, V., GAYRARD, V., POPOT, M., ANDREOLETTI, O. and TOUTAIN, P. Corticoid concentration are increased in the plasma and urine of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology*, 1999, **140**, 2422 - 2425.

SCHNEIDER, J. and HORSTMANN, P. Effects of incubating compound E and related steroids with various surviving rat tissues. *J. Biol. Chem.*, 1952, **196**, 629 - 639.

SCHREUDER, B. Animal spongiform encephalopathies - an update Part 1. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies. *Vet. Quarterly*, 1994, **16**, 174 - 181.

TOURON, C. Mise en évidence d'un syndrome hypercorticisme majeur chez la brebis atteinte de tremblante. Th : Med.vet., ENV, Toulouse, 2001,

USATEGUI, R., OLIVER, C., VAUDRY, H., LOMBARDI, G., ROZENBERG, I. and MOURRE, A. Immunoreactive alpha-MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. *Endocrinology*, 1976, **98**, 189 - 196.

VAN KEULEN, L., SCHREUDER, B., MELOEN, R., MOOIJ-HARKES, G., VROMANS, M. and LANGEVELD, J. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural Scrapie. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1228 - 1231.

WALKER, B., CAMPBELL, J., FRASER, R., STEWART, P. and EDWARDS, R. Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin. Endocrinol.*, 1992, **37**, 483 - 492.

WHITNALL, M., SMYTH, D. and GAINER, H. Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in external zone of the median eminence in normal rats. *Neuroendocrinology*, 1987, **45**, 5, 420 - 424.

YAMAOKA, K., TANIGAWARA, K., NAKAGAWA, T. and UNO, T. A pharmacokinetic analysis program (Multi) for microcomputer. *J. Pharmacobio-dyn.*, 1981, **4**, 879 - 889.

YE, X. and CARP, R. Histopathological changes in the pituitary glands of female hamsters infected with the 139H strain of scrapie. *J. Comp. Pathol.*, 1996, **114**, 291 - 304.

YE, X., CARP, R., YU, Y., KOZIELSKI, R. and KOZLOWSKI, P. Effect of infection with the 139H scrapie strain on the number, area and/or location of hypothalamic CRF- and VP-immunostained neurons. *Acta Neuropathol.*, 1994, **88**, 44 - 54.

TOULOUSE, 2001

NOM : GALEA-GRANDJEAN

PRENOM : JESSIE

TITRE : **EXPLORATION FONCTIONNELLE DE L'AXE CORTICOTROPE DE LA BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE.**

RESUME :

L'objectif de cette étude expérimentale était d'identifier l'origine de l'augmentation de production de cortisol par les glandes surrénales induite par la tremblante grâce à une exploration fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Pour cela les cinétiques temporelles des concentrations plasmatiques d'ACTH des brebis atteintes de tremblante ont été analysées et le taux de production d'ACTH a été déterminé chez 14 brebis (6 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante). Des épreuves de freination-stimulation de l'axe corticotrope ont également été réalisées. Nous avons ainsi montré que le taux de production d'ACTH des brebis en phase clinique de tremblante était augmenté d'un facteur 1,5 par rapport à celui des brebis saines. Quatre des 8 brebis atteintes de tremblante ont montré une diminution de la réponse à un test de freination faible à la dexaméthasone. L'administration de tétracosactide a induit un taux de production de cortisol chez les brebis malades 2 fois supérieur à celui des brebis saines alors que la sensibilité de l'hypophyse au CRF ovin n'a pas été perturbée par la maladie à prion.

Par conséquent, la tremblante naturelle est à l'origine d'un syndrome d'hypercorticisme associé à une augmentation de la sécrétion d'ACTH, à une réponse exacerbée des glandes surrénales à une stimulation par le tétracosactide et à une perturbation du rétrocontrôle négatif du cortisol. Nos résultats suggèrent que l'origine du syndrome d'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante est hypophysaire ou centrale et non corticosurrénalienne.

MOTS-CLES : BREBIS – TREMBLANTE – CORTISOL – ACTH – CRF – PHARMACOCINETIQUE

ENGLISH TITLE : **ASSESSMENT OF CORTICOTROPIC AXIS IN SCRAPIE-AFFECTED EWES**

ABSTRACT :

The aim of this study was to identify the origin of scrapie-induced increased secretion rate of cortisol by a functional study of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Therefore, temporal ACTH plasma concentration profiles were analysed and ACTH production rate was measured in 14 ewes (6 healthy and 8 scrapie-affected). Suppression and stimulation tests of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis were also performed. It was shown that the secretion rate of ACTH of diseased ewes was increased by a factor of 1,5, in comparison with that of healthy ewes. Four of the 8 scrapie-affected ewes exhibited a decreased response to a low dexamethasone suppression test. The administration of tetracosactide induced a cortisol production rate in diseased ewes to times greater than that obtained in healthy ewes, while the pituitary sensitivity to ovine CRF was not modified by the prion disease.

Thus, natural scrapie displays a syndrome of hypercorticism associated with an increased ACTH secretion, an hyperresponsiveness of the adrenals to a stimulation by tetracosactide, with a disturbed negative feed-back of cortisol. Our results suggest that the origin of the hypercorticism of ewes affected with natural scrapie would be the pituitary or the central nervous system and not the adrenals.

KEY WORDS : EWE – SCRAPIE – CORTISOL – ACTH – CRF – KINETIC